

肝移植のためのドナー肝の摘出・保存に関する生化学的考察

著者	櫻田 正壽
号	1055
発行年	1990
URL	http://hdl.handle.net/10097/20341

論 文 内 容 要 旨

【緒 言】

重症肝疾患に対し、欧米では肝移植が既に確立した治療となっており症例数は年々増加の一途にある。しかし施設により差はあるが移植された肝が当初より機能しないprimary graft non-functionに陥る症例が2-23%あると報告されており、現在のところ腎移植に対する透析の如く、肝に対する有効な補助療法がないため、ひとたびこの事態になると再移植を行わない限り患者は死に至るため重大な問題である。したがってこれを未然に防ぐために、保存肝のviabilityを判定する指標の確立および確実なドナー肝の摘出・保存法の確立の2点が臨床上最重要課題となっている。保存肝のviabilityについては組織のATP量や形態学的検索だけでは有効な指標とならないことが指摘されており、本研究ではエネルギー産生能の重要性に着目し、その主座であるミトコンドリアの呼吸能が保存肝のviabilityの指標となりえるか否かをブタを用いた同所性肝移植実験を行って検討した。この際、人工心肺を用いる臓器摘出法も試み、上記検討を加えるとともに、より長時間の保存を可能にするドナー肝の摘出法を模索した。以上、保存中に起こる問題以外に、primary graft nonfunctionの原因としてMcCordらは血清再開時の過酸化障害を想定しており、本研究では彼らの仮説に従ってこの可能性を検討した。

【方 法】

(1)15-25kgのブタをドナーとして肝を摘出、保存中の経時変化を調べた。(2)4h保存肝移植：15-25kgのブタより摘出した肝を4h保存後に同所性に移植した。(3)長時間保存肝の移植：以下の2群にわけた。Standard harvest群(Std.群)従来からの方法でドナー肝を摘出し、氷冷コリンズで12h保存した後に移植した。Core cooling群(C. C.群)人工心肺を用いてドナーを体外循環し、全身の血液を酸素化しながら冷却してゆき、脱血温が約10℃となった時点で肝を摘出した。摘出肝を氷冷乳酸化リンゲル液で灌流後コリンズ液で12h保存して移植した。以上の動物実験系を用いて移植成績を評価するとともに下記の生化学的検索を行った。(1)保存肝のミトコンドリア(Mit.)の酸素消費をクラーク型酸素電極を用いて測定し呼吸調節率(State 3/State 4)を算出した。(2)組織及びMit.画分のATP、ADP、AMP、を陰イオン交換カラムを用いたHPLCで分離・定量した。(3)肝組織及びMit.画分のアデノシン、イノシン、ヒポキサンチン、キサンチン、尿酸を逆相カラムを用いたHPLCで分離定量した。(4)細胞質画分(10万g上清)及びMit.画分のsuperoxide dismutase(SOD)活性をMcCord、Fridovichらの方法で、glutathione peroxidase(GPX)の活性をProhaskaらのcombination assay法でxanthine oxidase(XOD)活性を

Engersonらの方法で分光光学的に測定した。

【結 果】

保存肝の呼吸調節率：肝保存中Mit.呼吸調節率（RCR）は経時的に低下した。これはADPをATPに変換する際に供役する酸素消費であるState 3呼吸が低下するためであった。このように従来摘出法によれば（Std.群）経時的にRCRが低下するのに対し、人工心肺を用いて摘出したC. C. 群では、RCRが摘出時Std.群に比して有意に高くしかも摘出時の値が12h保存まで維持された。

移植成績と組織ATPの回復：4h保存肝すなわち新鮮肝移植では5日以上長期生存は全10例中9例、12h保存肝の移植ではStd.群6例中1例のみ生存に対しC. C. 群では6例中5例に長期生存を得た。また新鮮肝移植では、摘出時（従来法）著減する組織ATPが移植後1hで開腹肝の約80%まで回復を示した。これがStd.群12h保存肝の移植では摘出時著減したATPの回復は認められず、一方、C. C. 群では移植後1hで組織ATPの回復を認めた。

Mit. ATP：C. C. 群とStd. 群いずれも保存中経時的に減少したが、前者で摘出時から保存中いずれの時点においても後者の2倍前後の値を示した。

過酸化障害に関する検索：C. C. 群とStd. 群とでMit. 画分のSOD, GPX, XOD, の各活性およびMit. 画分のキサンチン, ヒポキサンチン量を測定したが24h保存中経時的に変化を認めず両群間に差を認めなかった。

【考 案】

長時間保存した肝の移植成績が不良であるとは経験上明らかであり、今回保存中に、ATP産生能を反映すると考えられるRCRの低下がおこることが示され、また長時間保存肝でもC. C. 群の如くRCRを維持したまま移植すれば組織ATPは回復し良好な移植成績を得られたことを考えあわせれば、保存肝のRCRがviabilityの指標となりうることが示唆される。またこの高いRCR値はMit. ATP量に依存することが考えられた。過酸化障害に関しては、McCordらの仮説に従いfreeradicalの発生系（XODおよびxanthine, hypoxanthine）消去系（SOD, GPX）両者の保存中の変動を調べたが有意の変化を示さずこの障害の可能性は低いと考えられた。以上、本研究ではRCRが保存肝viabilityの指標として適切なこと、人工心肺を用いた摘出法はRCRを高く維持することを立証、臨床においてprimary graft nonfunctionを予防する方法論を確立した。

審 査 結 果 の 要 旨

重症肝疾患の確立された治療法としてすでに肝移植が行われている欧米でも、移植肝が当初より機能しないprimary graft failureは、皆無ではなく、この事態に陥れば緊急にSecond graftを探し再移植を行う必要が生ずるため肝移植においては拒絶反応とならぶ重大事である。

本研究は、primary graft failure予防に資することを目的として、臓器保存中の変化をエネルギー産生能の観点より検討し、これに基づいて長時間保存肝の移植を可能にする方法の開発を目指している。また同時にMcCordらがgraft failureの原因のひとつとして提唱している血流再開時の過酸化障害説についても検討を加えている。

ミトコンドリア (Mit) の呼吸能は従来より肝の病態研究等で調べられてきておりエネルギー産生能を反映するといわれている。本研究ではとくにMit呼吸調節率 (RCR) とブタを用いた肝移植成績の関係を検討し、肝移植に際して保存肝のviabilityの指標としてMit. RCRの意義について述べている。即ち、通常の肝保存では、ADPをATPにリン酸化する際に共役する酸素消費が減少するためMit. RCRが経時的に低下してゆく。これと対応して新鮮肝移植では移植後組織ATPの回復がみられ移植された個体は長期生存するが、長時間保存肝はこれを移植しても組織ATPの回復は認められず個体の生存率は著しく低かったとしている。一方、従来の摘出、保存法のかわりに人工心肺で体外循環しながら酸素化した血液を冷却してゆく方法で肝を摘出するとそのMit. RCRは高い値であり摘出され長時間保存後も良好な値を維持した。この群の長時間保存肝の移植においては移植後組織ATPの回復が認められ個体の長期生存率が良好であった。この高い呼吸調節率をもたらす要因としてMit内存ATPが従来法に比較して人工心肺摘出法では高い値で維持され肝が摘出できるとしている。従来より保存肝のviabilityに関する研究としては、組織ATP含量の変化に着目した報告が多いが、本研究では再現性の高い高速液体クロマトグラフィーの条件を開発し、これを用いてATPを含む組織アデニンヌクレオチドを測定し、摘出時及び保存中経時的にATPが著減してゆくこと、またMit. RCRが高ければ移植後ATP量が回復することを確認し組織ATP量だけではviabilityの指標とはなりえないとしている。さらに、想定されている過酸化障害に関してもfree radical発生系、消去系の両因子より検討を加え肝移植においては大きな問題とならないとしている。

Mit. RCRが保存肝のviabilityの指標となりうること、また人工心肺摘出法はこのRCRを高く維持するため長時間保存肝の移植を可能にするとした点、肝移植の臨床に寄与するところが大きく、また他臓器の移植を進めていく上で大きな示唆を与えるものであり学位授与に値する。